第 24 卷 第 2 期　　昆 虫 学 报　　Vol. 24, No. 2
1981 年 5 月　　ACTA ENTOMOLOGICA SINICA　　May, 1981

棉铃虫感染核型多角体病毒后血淋巴蛋白的变化

丁 翠　　蔡秀玉
（中国科学院动物研究所）

摘要　本文使用聚丙烯酰胺凝胶盘状电泳等技术测定棉铃虫 *Heliothis armigera* 感染核型多角体病毒后血淋巴蛋白浓度和蛋白类型的变化。5 龄初期感病幼虫血淋巴蛋白总浓度在感染后 1—3 天缓慢上升，到第 4 天下降；同期的健康幼虫血淋巴蛋白浓度却持续上升。血淋巴蛋白类型的变化是：(1) 普通蛋白在健康幼虫中至少有 13 条宽窄不同的带，而感病幼虫在感染后前 3 天与健康幼虫无大区别，但感病后第 4 天蛋白带主带减少；(2) 糖蛋白的带数在健康幼虫中随时间增长而增加，每条带的浓度也随之增加；感病幼虫糖蛋白的带比健康幼虫的少，蛋白浓度也相应低。(3) 感病幼虫脂蛋白的变化几乎和健康幼虫无区别。健康与感病幼虫血淋巴萤光物质的变化趋势亦不同。但二个毒株感病幼虫血淋巴蛋白之间的差异不明显。

前　言

昆虫血淋巴是昆虫循环系统的主要组成部分，其蛋白质的变化是昆虫新陈代谢正常与否的一个指标。通过对感病昆虫血淋巴蛋白的研究可以了解病毒在寄主组织内复制时血淋巴中蛋白质的变化。已经知道在核型多角体病感染时脂肪体是最敏感的复制场所 (Adams et al., 1968; Vail et al., 1969)；而在昆虫正常代谢中，脂肪体又是血淋巴蛋白合成和分泌的中心 (Shigematsu, 1958)。对感病后血淋巴蛋白的研究可间接证明感染脂肪体中蛋白分解和合成的改变；幼虫发育后期脂肪体合成血淋巴的活性较高，感染幼虫在此时期内血淋巴蛋白变化最大，也最能反应感病后脂肪体代谢的能力 (Van der Greest et al., 1969)。国外对感染核型多角体病后血淋巴变化的研究早有报道 (Bergold et al., 1947; Shigematsu et al., 1958; Martignoni et al., 1964; Aizawa, 1958; Watanabe, 1967; Van der Greest et al., 1969)。但大都属于血淋巴蛋白浓度或类型的单项研究，直到七十年代才有人 (Young et al., 1971) 把二者有机地联系在一起。本文对比了感染前后棉铃虫血淋巴的变化，并将此种变化用于鉴定相近二个病毒株导致的病变上。

材 料 和 方 法

材料

1. 棉铃虫虫种　从北京郊区采集由本实验室用半人工饲料饲养的健康棉铃虫幼虫。

2. 棉铃虫病毒种　江苏棉铃虫核型多角体病毒系由复旦大学生物系昆虫教研组提供；湖北棉铃虫核型多角体病毒由湖北华中师范学院生物系昆虫病毒教研组供给。

3. 病毒多角体的纯化　5 龄初期幼虫用含 1×10^7 多角体/毫升悬液的半人工饲料感染(口服)致死，死虫加水研碎后多层纱布过滤，滤液用多种速度离心 (500、1000、2000、

本文于 1980 年 1 月收到。

4000 转/分)，获得较纯的多角体，置 4℃ 冰箱内备用。

4. 血淋巴样品的制备　新脱皮的 5 龄幼虫喂食含有 1.5×10^7 多角体/毫升的半人工饲料。感染 1、2、3、4 天后的幼虫剪腹足取血淋巴，经 3,500 转/分离心，上清液置 0℃ 冰箱内保存备用。对照棉铃虫喂食无病毒的半人工饲料，按同样时间和方法取正常血淋巴。

方法

1. 血淋巴蛋白总浓度的测定

采用改进的 Folin 试剂法 (Lowry et al., 1951)：取 30 微升血淋巴上清液用重蒸水稀释 200 倍，吸 1 毫升稀释液加入硫酸铜酒石酸钾混合碱液 5 毫升，10 分钟后再加入 0.5 毫升 Folin 液摇匀，38℃ 水浴保温 30 分，在国产 721 型分光光度计比色，比色波长为 680 毫微米。用结晶牛血清蛋白(上海东风试剂厂出品)作标准曲线。

2. 聚丙烯酰胺凝胶盘状电泳

1) 电泳

按"垂直管型分析盘状电泳"(莽克强等，1975) 的方法进行：每管加样量为 5—10 微升；凝胶浓度为 7.5%；缓冲液选用 Tris-甘氨酸系统，pH8.6；电泳在室温下进行，电流为 3 毫安/管，时间 1—1.5 小时。

2) 染色

a. 普通蛋白的染色：1% 考马斯亮蓝 R_{250} 用 12.5% 三氯醋酸稀释 20 倍后染色 2 小时，倾去染液，再用 7.5% 三氯醋酸脱色。普通蛋白被染成深蓝色。

b. 糖蛋白的染色：凝胶先用 2.5% 过碘酸钠醋酸混合液氧化 8 小时，放入三氯醋酸、冰醋酸混合液内洗涤，再用许夫 Folin 试剂染色 8 小时 (4℃ 冰箱内进行)，硫酸氢钾盐混合液脱色后，糖蛋白被染成玫瑰红色。

c. 脂蛋白的染色：将样品预先和苏丹黑 B 酒精饱和液按 1:10 或 1:5 的比例混合，于 4℃ 冰箱过夜。电泳后用 7.5% 三氯醋酸固定脱色。脂蛋白被染成棕色。

3. 萤光物质的测定

30 微升血淋巴上清液用重蒸水稀释 200 倍，放入意大利 Optia 115 型萤光分光光度计内比色。激发峰为 350 毫微米，萤光峰为 420 毫微米。

结 果 和 讨 论

一、血淋巴蛋白总浓度的变化

图 1 表示二个毒株感病幼虫及对照幼虫血淋巴蛋白总浓度的变化。感病幼虫血淋巴的蛋白总浓度在整个发病过程中都低于健康幼虫。健康幼虫的血淋巴蛋白总浓度逐日增加，可从第 1 天的 20 毫克/毫升增至第 4 天的 41.8 毫克/毫升。感病幼虫的蛋白量从第 1 天到第 3 天只增加了 4 毫克/毫升，到第 4 天反而下降。上述结果与 Martignoni et al., (1964)和 Young et al., (1970)结论相同，即感病幼虫血淋巴蛋白浓度趋向于减少。Shigematsu (1958)、Price (1966;1969)、Chippendale (1969) 等人曾使用电泳和同位素标记等方法证明家蚕(*Bombyx mori*)、丽蝇 (*Calliphora erythocephala*) 和大菜粉蝶(*Pieris brassicae*)的脂肪体组织与血淋巴蛋白之间有着密切的关系。即脂肪体合成的蛋白质在一定时期释放到血淋巴中去。脂肪体又可将血淋巴中的蛋白贮存以供变态之用。并证明家蚕(*Bombyx*

mori) 脂肪体释放到血淋巴中的蛋白有 2 种，分别称为 G_1 和 G_2 球蛋白。根据它们的这种关系不难看出由于核型多角体病毒是在脂肪体内进行复制的，感染期间脂肪体的正常功能受到因病毒增殖而引起的阻碍，释放到血淋巴中的蛋白质大大减少，故随着病程的发展血淋巴的总蛋白浓度增加不多，而到第4天因大部分脂肪组织均被感染，其正常机能被完全破坏，加之病毒本身还要不断吸取脂肪体内的蛋白满足合成病毒蛋白的需要(Young et al., 1971; Van der Greest et al., 1969)，因此出现血淋巴蛋白总量降到最低点的情况。但从图 1 却看不出二个病毒株感染后寄主血淋巴浓度之间的明显区别。

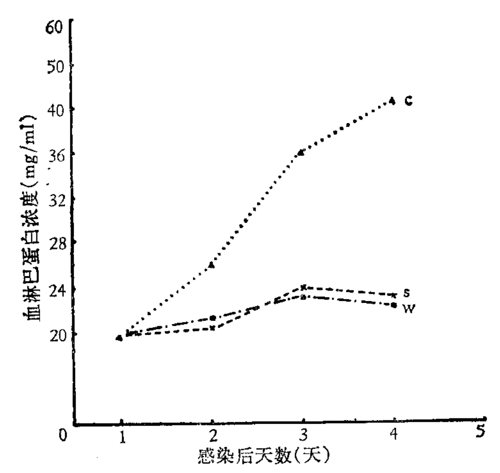


图 1 棉铃虫核型多角体病毒感染后 5 龄幼虫血淋巴蛋白浓度的变化

c. 健康幼虫 s. 江苏棉铃虫病毒感染的幼虫 w. 湖北棉铃虫病毒感染的幼虫

二、血淋巴蛋白类型的变化

a. 普通蛋白

图 2a 中可看出第 1 天健康幼虫的蛋白带共有 9 条，第 2 天出现新的弱带，蛋白带增至 13 条以上，且泳动率低的高分子量蛋白带的浓度加重，这是因为 5 龄幼虫血淋巴中蛋白浓度的增加主要表现在泳动率低的高分子量蛋白带浓度的增加 (Young et al., 1971)。第 4 天在泳动率低的高分子量蛋白带中出现几条新带(最明显的为图 2a 中 P 带)。感病幼虫的蛋白带在第 1、2、3 天中均与健康幼虫相似，只是每条带均较弱，说明浓度较低。直至第 4 天表现出蛋白类型的不同，除几个高分子量蛋白带浓度变小外，在健康幼虫中出现的泳动率低的主带部分消失，特别是 P 带 (图 2a)。这些带曾被认为是构成多角体蛋白的主要材料 (Van der Greest et al., 1969)。而在感病幼虫中这些带的消失可能是因为病毒在脂肪体内复制，吸取了脂肪体内的蛋白为营造多角体蛋白之用。图 2a 中二个不同毒株的血淋巴蛋白类型的变化几乎相同。

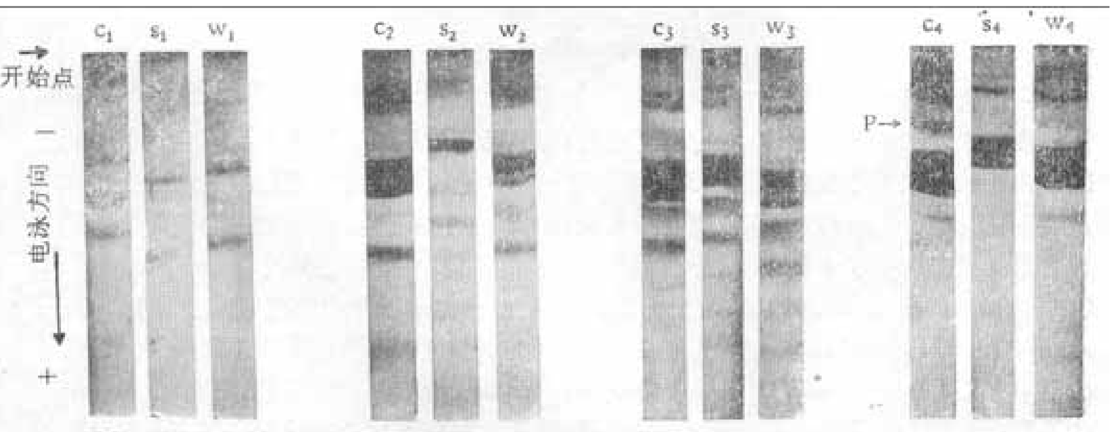


图 2a 健康幼虫 (c) 及湖北 (w)、江苏 (s) 棉铃虫核型多角体病毒感染幼虫的血淋巴普通蛋白电泳图。1、2、3、4 为感染后的天数；P 为增加的新带。

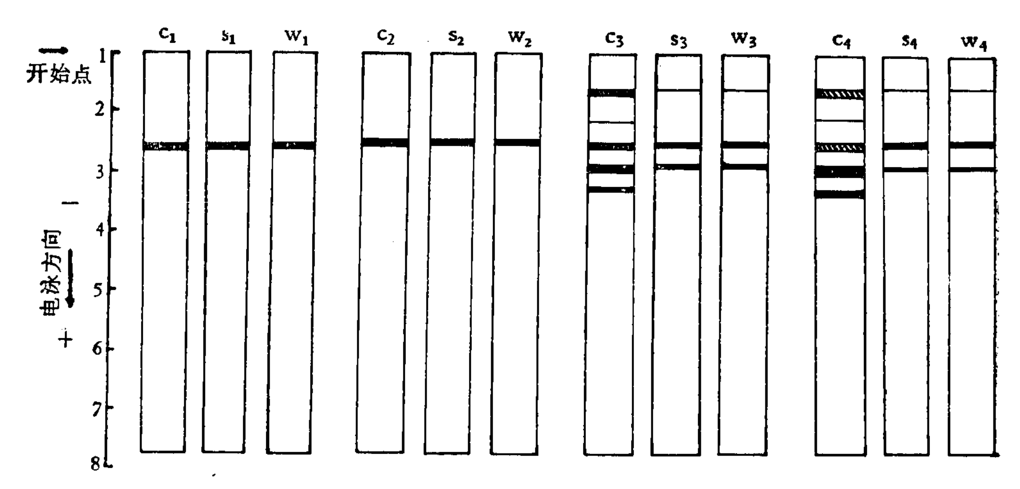


图 2b　健康幼虫 (c) 及湖北 (w)、江苏 (s) 棉铃虫核型多角体病毒感染幼虫的血淋巴糖蛋白电泳图。1、2、3、4 为感染后的天数。

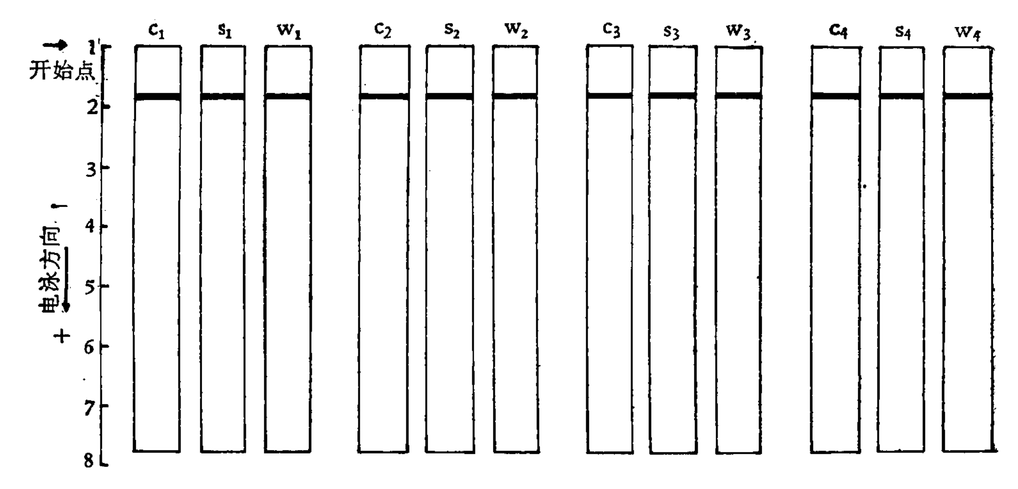


图 2c　健康幼虫 (c) 及湖北 (w)、江苏 (s) 棉铃虫核型多角体病毒感染幼虫的血淋巴脂蛋白电泳图。1、2、3、4 为感染后的天数。

b. 糖蛋白

糖蛋白为复合蛋白，在感病过程中可观察到幼虫血淋巴中糖蛋白带数的减少和浓度的降低。结果与 Young et al (1971) 的报道相似，但带数较少。健康幼虫的糖蛋白在 4 天内由 1 条增至 5 条，主带的浓度也逐日增加；但感病幼虫中第 3、4 天只出现 3 条带。且浓度降低 (图 2b)。二个不同病毒株的血淋巴糖蛋白变化也基本一致。

c. 脂蛋白

脂蛋白的变化与 Komano et al.(1966) 和 Young et al.(1971) 的结论均不同。健康和感病幼虫血淋巴内脂蛋白的区带在 4 天中的变化完全相同，仅有一条泳动率低的窄带 (图 2c)。脂蛋白不发生变化的原因可能有二：一是脂蛋白代谢不受核型多角体病毒复制的影响；二是脂蛋白为复合蛋白，分子量较大，本实验使用的聚丙烯酰胺凝胶浓度不太适用，致使效果不明显。从上述结果看出血淋巴蛋白浓度和蛋白类型变化的一致性。

这些蛋白带浓度的总和就是血淋巴蛋白浓度的总量；而血淋巴蛋白总浓度的增加和减少又反映在每个蛋白带浓度的增加和减少上。

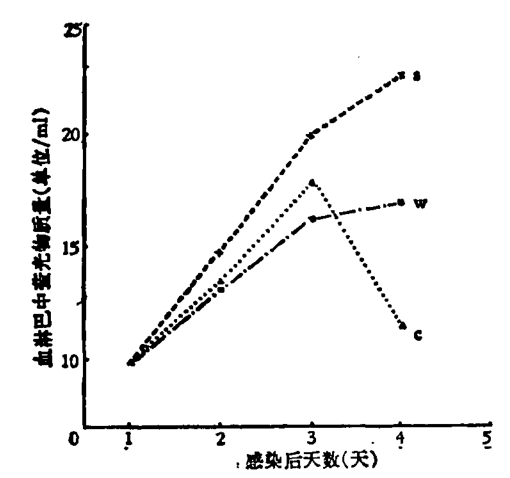


图 3 棉铃虫核型多角体病毒感染后血淋巴中萤光物质的变化

c. 健康幼虫 s. 江苏棉铃虫病毒感染的幼虫 w. 湖北棉铃虫病毒感染的幼虫

三、血淋巴中萤光物质的变化

蛋白中能发萤光的成分为色氨酸和酪氨酸（陈国珍，1975）。昆虫血淋巴中丰富的酪氨酸与脱皮时的黑化有关。从图 3 看出健康幼虫成长中酪氨酸的量趋于减少，而感病幼虫却表现为增加。此结果与 Van der Greest et al.（1967）的结果一致。这种变化和病毒复制之间存在着何种关系还不太清楚，但 Shapiro et al.（1971）曾报道感染核型多角体病的幼虫血淋巴中酪氨酸的增加与病毒蛋白和多角体蛋白的合成有关。本实验结果表明感染核型多角体病毒的幼虫血淋巴蛋白的变化与健康幼虫的不同。而二种病毒株感染幼虫之间血淋巴蛋白变化的差异不显著。血淋巴蛋白的病理变化是否可以作为核型多角体病毒种株间毒力不同的依据，仍需深入研究后方能定论。

参 考 文 献

陈国珍 1975 萤光分析法。科学出版社。

莽克强、徐乃正、方荣祥 1975 聚丙烯酰胺凝胶电泳。科学出版社。

Adams, J. R. and T. A. Wilcox 1968 Histopathology of the almond moth, *Cadra coutella*, infected with a nuclear polyhedrosis virus. *J. Invert. Pathol.*, 12(2): 269—74.

Aizawa, K. and S. Murai 1958 Electrophoresis of the blood of the silkworm, *Bombyx mori*, on filter paper (2nd Report). *Physiol. Chem. Biol.* (Tokyo), 4, 23—6.

Bergold, G. H. and H. Friedrich-Freksa 1947 Zur Grosse und Serologie des *Bombyx mori* Polyedervirus. *Z. Naturforsch. Mikrosk. Anat.* 2, 410—4.

Chippendale. G. M. and B. A. Kilgy 1969 Relationship between the protein of the hemolymph and fat body during development of *Pieris brassicae*. *J. Ins. Physiol.*, 15(5): 905—26.

Komano, T. and M. Himeno 1966 Studies on lipids of the hemolymph of silkworm, *Bombyx mori*, during the course of nuclear polyhedrosis. *J. Invert. Pathol.*, 8(1): 67—74.

Lowry, O. H. and N. Rosebrough 1951 Protein measurement with the folin phenol regent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265—75.

Martignoni, M. B. and J. E. Milstead 1964 Hypoproteinemia in a noctuid larvae during the course of nuclearpolyhedrosis. *J. Insect Pathol.*, 6(3): 517—31.

Price, G. M. 1969 Protein synthesis and nucleic acid metabolism in the fat body of the larvae of the blowfly, *Calliphora erythrocephala*. *J. Insect Physiol.*, 15(5): 931—44.

Price, G. M. and T. Bosman 1966 The electrophoretic separation of protein isolated from the larvae of the blowfly, *Calliphora erythrocephala*, *J. Insect Physiol.* 12(5): 741—5.

Shapiro, M. and C. M. Ignoffo 1971 Protein and free amino acid changes in the hemolymph of *Heliothis zea* larvae during nucleopolyhedrosis. *J. Invert. Pathol.* 17(2): 327—32.

Shigematsu, H. 1958 Synthesis of blood protein by the fat body in the silkworm, *Bombyx mori* L. *Nature* (London), 182, 880—2.

Shigematsu, H. and H. Takeshita 1958 Changes in quality of nucleic acid and protein in the fat body of the silkworm in a course of contracting quandice. *J. Seric. Sci. Jap.*, 27, 66—70.

Van Der Greest, L. P. S. and R. Craig 1967 Biochemical changes in the larvae of the variegated cutworm. *Peridroma sausia*, after infection with a nuclear-polyhedrosis virus. *J. Invert. Pathol.* 9(1): 43—53.

Van Der Greest, L. P. S. and H. J. M. Wassink 1969 Hemolymph proteins of the cabbage armyworm, *Mamestra brassicae*, after infection with a nuclearpolyhedrosisvirus. J. Invert. Pathol., 14(3): 419—20.

Vail. P. V. and I. M. Hall 1969 The histopathology of a nuclear polyhedrosis in larvae of the cabbage looper, *Trichoplusia ni*, related to symptoms and mortality. J. Invert. Pathol., 13(2): 188—98.

Watanabe, H. 1967 Electrophoretic separation of the hemolymph proteins in the fall webworm. *Hyphantria cunea*, infected with a nuclear polyhedrosis virus. J. Invert. Pathol., 9(3): 570—1.

Young, S. Y. and S. J. Lovell 1971 Hemolymph proteins of *Trichoplusia ni* during the course of a nuclear polyhedrosis virus infection. J. Invert. Pathol., 17(3): 410—8.

Young, S. Y. and A. H. Scott 1970 Immunoelectrophoresis of hemolymph of the cabbage looper, *Trichoplusia ni*, during the course of a nuclear polyhedrosis virus infection. J. Invert. Pathol., 16(1): 57—62.

HEMOLYMPH PROTEIN CHANGES OF *HELIOTHIS ARMIGERA* (HÜBNER) AFTER INFECTION WITH NUCLEAR POLYHEDROSIS VIRUSES

DING TSUEY　　TSAI SIU-YU

(*Institute of Zoology, Academia Sinica*)

The hemolymph proteins of the fifth instar larvae of the cotton bollworm, *Heliothis armigera*, were investigated after infection with nuclear polyhedrosis viruses. The concentration of hemolymph protein in diseased larvae was found to be lower than that in the healthy ones during the course of the disease. The concentration of protein in healthy larvae increased rapidly for four days while that in diseased larvae increased slightly until the 3rd day and decreased on the 4th day.

Disc-electrophoresis of the hemolymph on 7.5% acrylamide gels showed that the changes of the hemolymph protein pattern in healthy and diseased larvae differed in several respects:

(1) General protein. At least 13 protein bands were found in the healthy larvae. The same number of bands was found in the diseased ones in the first 3 days, although the portein concentration in these bands was much less than in the healthy larvae. On the 4rt day, there was a decrease in the major bands of the diseased larvae.

(2) Glycoprotein. Glycoprotein concentration in the healthy larvae showed a increase whereas there was a decrease in the diseased larvae. Special staining techniques revealed that five glycoprotein bands were present in the healthy larvae and three bands in the diseased ones.

(3) Lipoprotein. The results of lipoprotein change in healthy and diseased larvae were similar. Only one lipoprotein band was found in both of them.

The difference of fluorescent substance of the hemolymph in healthy and diseased larvae could be detected.

Little difference could be detected in the hemolymph protein changes between larvae infected with the two strains of nuclear polyhedrosis virus.